



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Mecanismos neuronales de acción de DYN-A₂₋₁₇ en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar

al grado de **Magíster en Biotecnología**

Director de tesis: Dr. Claudio Pérez-Leighton

Center for Integrative Medicine and Innovative Science

Facultad de Medicina

Universidad Andrés Bello.

TABITA MILLARAY BARRIENTOS VILCHES

Santiago, Chile.

Diciembre, 2018.



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Biológicas

Ingeniería en Biotecnología

Mecanismos neuronales de acción de DYN-A₂₋₁₇ en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

TABITA BARRIENTOS VILCHES

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Claudio Pérez-Leighton, en el laboratorio de la Facultad de Medicina en el Centro Integrativo e Innovación Científica (CIMIS) de la Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación.

Dr. Claudio Perez-Leighton
Director de Tesis

Dr. Jimmy
Comisión de Tesis

Dr. Lorena Varela
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE
Diciembre, 2018

DEDICATORIA

A mis amados padres Leonel Barrientos Salas y Susan Vilches Vera. Mi apoyo incondicional, mis pilares y ejemplos de vida.

A mi amada familia Francisco Parra Lathrop e Isidora Antonia Parra Barrientos. Mis amores, el motivo y motor de mi vida para trabajar dando siempre lo mejor de mí para alcanzar cada una de mis metas y ser una mejor persona día a día.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONDECYT “Rol de los neuropéptidos de orexina y dinorfina en balance energético y susceptibilidad individual a obesidad 1150274, el cual hizo posible el desarrollo de mi tesis y aporte en el financiamiento de esta.

A mi familia. Leonel Barrientos Salas, Susan Vilches Vera y Emanuel Barrientos, por estar siempre presentes entregándome su amor y apoyo incondicional. A mis amados padres por darme los medios para poder estudiar y poder desarrollarme como profesional. Por guiarme y enseñarme día a día principios y valores para ser una persona correcta en la vida. Gracias por su amor y apoyo incondicional, sus enseñanzas y consejos durante toda mi vida, mis pilares y ejemplo de vida. Finalmente, a mi compañero de vida, amigo y cómplice Francisco Parra Lathrop, por tu amor y apoyo día a día desde que iniciamos una vida juntos y hoy junto a nuestra hermosa hija Isidora y por la paciencia, sobre todo en esta última etapa del desarrollo de mi tesis.

Al Doctor, mentor y director de mi tesis Claudio Pérez-Leighton quien me entregó la oportunidad para poder realizar mi tesis en su laboratorio, me entrego sus conocimientos, su constante apoyo y me enseñó a ser siempre responsable, organizada y puntual.

A mis amigas de vida y universidad (Maite Lopetegui, Sandra Millar, Victoria Barrientos, Marcia Fuentes, Daniela González, Javiera Catalán, Rafaella Lazzaro), por su amistad y apoyo durante todos estos años, por estar siempre presentes a pesar de la distancia física y los cambios en nuestras vidas. Finalmente, a mis amigos y compañeros del laboratorio quienes compartieron conmigo muchos momentos durante el desarrollo de mi tesis, entregándome su apoyo y compañía.

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	4
2. ABREVIACIONES	7
3. INTRODUCCION	8
3.1. LOS NEUROPEPTIDOS DE DYN: PEPTIDOS CON ACCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	8
3.2. SÍNTESIS DE DYN	9
3.3. NEUROPEPTIDOS DE DYN NO OPIOIDES: DYN-A ₂₋₁₇	10
3.4. CONTROL HIPOTALÁMICO DE LA INGESTA DE ALIMENTO.	12
3.4.1. EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO (PVN) COMO POSIBLE SITIO DE ACCIÓN DE LA DYN-A ₂₋₁₇ .	14
3.5. ROL DEL PEPTIDO NO OPIOIDE DYN-A ₂₋₁₇ EN CONTROL DE ALIMENTACIÓN Y ACTIVIDAD FÍSICA E INTERACCIÓN CON NEUROPEPTIDOS DE OREXINA	16
3.6. CRF COMO POSIBLE MEDIADOR DE EFECTOS DE DYN-A ₂₋₁₇ EN PVN	17
3.7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3.8. HIPÓTESIS	18
3.9. OBJETIVO GENERAL	18
3.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIALES Y METODOS	19
4.1. MODELO ANIMAL PARA ESTUDIO	19
4.2. CIRUGÍA E IMPLANTACIÓN DE CÁNULA	19
4.3. PEPTIDOS	20
4.4. INYECCIONES	20
4.5. MEDICIÓN DE INGESTA DE ALIMENTOS	20
4.6. PREPARACIÓN DE TEJIDO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA	21

4.7.	TINCIÓN DE NISSL CON TIONINA PARA CONFIRMACIÓN DE POSICIONAMIENTO DE CÁNULA	
	21	
4.8.	INMUNOHISTOQUÍMICA PARA FOS	21
4.9.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS PARA FOS	22
4.10.	ESTANDARIZACIÓN DETECCIÓN DE CRF POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO	23
4.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	24
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	24
5.1.	Experimento 1: Efectos del bloqueo de receptores de CRF en la acción de DYN-A ₂₋₁₇ en ingesta de alimento.	24
5.2.	Experimento 2: Demostrar que DYN-A ₂₋₁₇ activa neuronas en PVN incluyendo neuronas que expresan CRF.	26
5.3.	Experimento 3: Efecto de DYN-A ₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático.	27
6.	RESULTADOS	28
6.1.	EXPERIMENTO 1: ACRF ₉₋₄₁ ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE CRF BLOQUEA LOS EFECTOS DE DYN-A ₂₋₁₇ EN INGESTA DE ALIMENTOS.	28
6.2.	EXPERIMENTO 2: EFECTO DE DYN-A ₂₋₁₇ EN ACTIVACIÓN DE NEURONAS DE PVN INCLUYENDO CRF.	29
6.2.1.	Efecto de DYN-A ₂₋₁₇ en activación de neuronas que expresan FOS.	29
6.2.2.	Efecto de DYN-A ₂₋₁₇ en activación neuronal de CRF.	30
6.2.3.	Efecto de DYN-A ₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático	31
7.	DISCUSION	32
7.1.	EFECTOS DEL BLOQUEO DE RECEPTORES DE CRF EN EL CEREBRO DYN-A ₂₋₁₇ EN INGESTA DE ALIMENTOS	32
7.2.	EFECTOS DE DYN-A ₂₋₁₇ EN LA ACTIVACIÓN DE NEURONAS DE PVN.	34
8.	CONCLUSION Y PROYECCIONES	36
9.	REFERENCIAS	38

INDICE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de los diferentes neuropéptidos de dinorfina.....	10
Figura 2. Esquema principales vías cerebrales de control de la ingesta de alimentos.....	13
Figura 3. Esquema eje HPA.....	15
Figura 4. Ejemplo cuantificación células inmunorreactivas para FOS en PVN	22
Figura 5. Diseño experimental objetivo 1	25
Figura 6. Diseño experimental objetivo 2.....	26
Figura 7. Diseño experimental objetivo 2.....	27
Figura 8. Efecto del antagonista del receptor de CRF α CRF ₉₋₄₁ y el péptido no opioide DYN-A ₂₋₁₇ en PVN en la ingesta de alimento.....	29
Figura 9. Efecto de la inyección del péptido no opioide DYN-A ₂₋₁₇ en activación de neuronas que expresan FOS en PVN.....	30

Figura 10. Efecto de la inyección del péptido no opioide DYN-A ₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático.....	31
---	-----------

Figura 11. Modelo propuesto.....	37
---	-----------

INDICE TABLAS

Tabla 1. Protocolo tinción de Nissl con tionina para posicionamiento de cánulas.....	45
---	-----------

Tabla 2. Protocolo estándar para inmunohistoquímica	46
--	-----------

1. RESUMEN

La dinorfina (DYN) describe a una familia de neuropéptidos que regulan múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la ingesta de alimentos. Estos neuropéptidos se pueden clasificar en opioides y no-opioides, dependiendo si sus efectos son mediados por la activación de receptores acoplados a proteína G del tipo opioide. Se sabe que los péptidos DYN opioide participan en ingesta de alimentos. Sin embargo, el rol del péptido no opioide DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos es desconocido. Nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) aumenta la ingesta de alimentos. En PVN se expresan diversos neuropéptidos incluyendo el factor liberador de corticotropina (CRF), involucrado en respuesta a estrés y regulación de la ingesta de alimentos. El **objetivo** de esta tesis fue determinar los mecanismos neuronales de acción de DYN-A₂₋₁₇ en PVN que median su efecto en ingesta de alimento. La evidencia actual sugiere que el efecto de DYN-A₂₋₁₇ en alimentación sería consistente con la activación en PVN de neuronas de CRF provocando una liberación local de CRF en este núcleo, pero esto no ha sido demostrado. Nuestra **hipótesis** es que DYN-A₂₋₁₇ aumenta la ingesta de alimento activando neuronas que expresan el neuropéptido CRF en PVN. En primer lugar, se evaluó si el bloqueo local de receptores de CRF disminuye los efectos de la inyección en PVN de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos mediante la inyección en ratones del antagonista del receptor de CRF α CRF₉₋₄₁ en PVN. En segundo lugar, se evaluó mediante inmunohistoquímica la activación de neuronas del PVN, incluyendo las neuronas que expresan CRF a partir de la inyección en PVN de DYN-A₂₋₁₇ en ratones. Finalmente, se evaluó si la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumenta los niveles de ACTH plasmática en ratones. Nuestros resultados indican que el pretratamiento con el antagonista del receptor de CRF en PVN bloquea los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimento y que la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumenta el ACTH plasmático. Estos resultados sugieren que DYN-A₂₋₁₇ es un neuropéptido que promueve la ingesta de alimento a través de sus acciones en PVN, las cuales dependerían de la señalización local de CRF en PVN. La **importancia** de este estudio es la identificación de mecanismos neuronales que contribuyen a la regulación

de la alimentación y del balance energético, facilitando así el diseño de posibles terapias para el tratamiento de patologías de trastornos de alimentación.

2. ABREVIACIONES

aCSF: Líquido encéfalo raquídeo artificial

ACTH: Hormona adrenocorticotropina

BSA: Albumina de suero bovino

CHOW: Comida estándar (pellet)

CRF: Factor liberador de corticotropina

DAB: Diaminobenzidina

DYN: Dinorfina

FOS: Marcador de actividad neuronal

ICV: Intra-cerebroventricular

LH: Hipotálamo Lateral

NMDA: ácido N-metil-D-aspartico

OXA: Orexina-A

OXB: Orexina-B

OXR1: Receptor 1 Orexina

OXR2: Receptor 2 Orexina

PBS: Solución Tampón Fosfato Salino

PFA: Paraformaldehido

PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo

SPA: Actividad física espontánea

3. INTRODUCCION

3.1. Los neuropéptidos de DYN: Péptidos con acción en el sistema nervioso central

Los neuropéptidos de dinorfina (DYN) son expresados por neuronas del sistema nervioso central en la médula espinal y distintas zonas del cerebro, incluyendo el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo y el cuerpo estriado entre otras (Schwarzer, 2009). Estos neuropéptidos participan en la regulación de distintos procesos fisiológicos, incluyendo dolor, función gastrointestinal, función autonómica, aprendizaje, memoria, recompensa, adicción e ingesta de alimentos (Schwarzer, 2009; Bodnar, 2016).

Los neuropéptidos de DYN son producidos a partir de un único precursor peptídico, llamado prepro-dinorfina (Young *et al.*, 1987; Schwarzer, 2009). Los neuropéptidos de DYN se pueden clasificar como opioide o no-opioide dependiendo de si sus efectos biológicos son mediados por receptores acoplados a proteína G del tipo opioide (Wollemann y Benyhe, 2004). A pesar de que los neuropéptidos de DYN no opioide se descubrieron en 1982, la investigación acerca de los neuropéptidos DYN se ha centrado en los neuropéptidos DYN opioide. Por tanto, el rol fisiológico de los neuropéptidos de DYN no opioide aún no es claro.

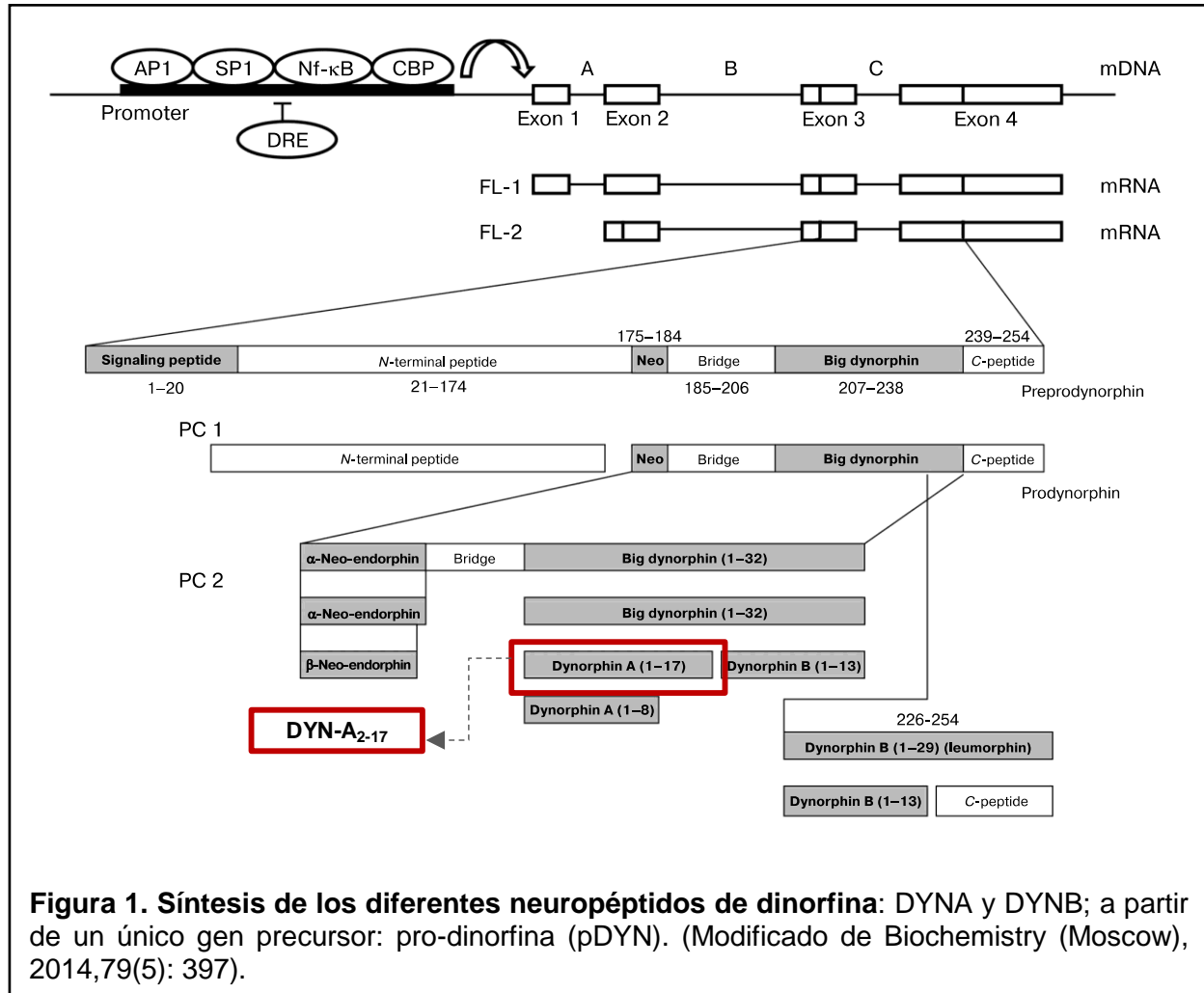
La activación de receptores opioides blanco de neuropéptidos de DYN opioide promueve la ingesta de alimentos en distintas zonas del cerebro, incluyendo el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). En ratas, la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de DYN-A₁₋₁₇, agonista selectivo para el receptor opioide tipo kappa, aumenta la ingesta de alimentos (Gosnell *et al.*, 1986a). Además, la administración en PVN de DYN-A opioide en ratas o en ratones macho aumenta significativamente la ingesta de alimento estándar de forma dosis dependiente (Gosnell *et al.*, 1986b; Gac *et al.*, 2016). La inyección i.c.v. de agonistas opioides como DAMGO, agonista del receptor opioide tipo μ , aumenta la ingesta de alimentos preferidos en ratas, mientras que la inyección en PVN de antagonistas de receptores opioides tipo kappa o μ disminuye la ingesta de alimentos preferidos en ratas (Taha, 2010). En conjunto, esta evidencia señala que los péptidos

DYN opioides regulan la ingesta de alimentos. Sin embargo, el rol de los neuropéptidos de DYN no opioide en la regulación de la ingesta de alimentos no es claro. En las siguientes secciones discutiremos evidencia acerca de las vías de síntesis de neuropéptidos de DYN, y la evidencia acerca del rol fisiológico de DYN no opioides.

3.2. Síntesis de DYN

La familia de neuropéptidos DYN incluye al menos seis miembros, todos producidos a partir de un gen precursor llamado pro-dinorfina (pDYN) (Young *et al.*, 1987; Schwarzer, 2009). El proceso de síntesis de los péptidos DYN se resume en la **Figura 1**. El gen pDYN contiene cuatro exones. Los exones 1 y 2 codifican para la mayoría de la región 5' no traducida, los exones 3 y 4 contienen la secuencia de codificación; el exón 3 codifica un péptido señal. A partir de este gen y mediante un proceso de splicing alternativo se generan dos transcritos (FL1 y FL2), que contienen cada uno la secuencia de codificación completa de pDYN. La forma predominante FL1 está altamente expresada en estructuras límbicas tales como el núcleo accumbens y la amígdala, mientras que la expresión de FL2 está restringida a unas pocas áreas del cerebro, incluido el hipotálamo. La traducción de estos transcritos genera el precursor peptídico prepro-dinorfina. Este precursor es procesado por distintas endopeptidasas (prohormonas convertasas (PC), PC1 y PC2 y Carboxipeptidasa E) generándose diferentes péptidos de dinorfina. El procesamiento por PC2 genera los péptidos α -neoendorfina, DYN-A₁₋₁₇, DYN-A₁₋₈ y DYN-B. Este procesamiento se potencia por la carboxipeptidasa E (Schwarzer, 2009). DYN-A₂₋₁₇, también conocido como des-tyr-DYN es sintetizado a partir de degradación enzimática del extremo amino terminal de DYN-A (Young *et al.*, 1987), pero la o las enzimas que participan en este proceso no han sido identificadas. La pérdida del grupo amino terminal de los péptidos de DYN-A es suficiente para eliminar la afinidad por el receptor kappa opioide (Lee *et al.*, 2014). Por lo tanto, a partir de la degradación enzimática del péptido

preprodinorfina se generan los diferentes tipos de dinorfinas opioides y no opioides como DYN-A₂₋₁₇.



3.3. Neuropéptidos de DYN no opioides: DYN-A₂₋₁₇

La existencia de neuropéptidos DYN con acción no opioide fue descrita por primera vez en 1982 (Walker *et al.*, 1982a; Walker *et al.*, 1982b). En estos estudios, se demostró que el péptido DYN-A₂₋₁₇ o desTyr-DYN tiene efectos fisiológicos que no dependen de la activación de receptores opioides. La aplicación por iontoforesis de DYN-A₂₋₁₇ a neuronas piramidales del hipocampo (CA1 Y CA3) aumentó su frecuencia de disparo. Además, la

administración i.c.v de DYN-A₂₋₁₇ en ratas aumenta la actividad neuronal registrada mediante electroencefalograma (Walker *et al.*, 1982a) y bloquea el efecto analgésico de la administración subcutánea de morfina (agonista de receptores opioides) en el test de latencia de retirada de la cola frente a un estímulo térmico (Walker *et al.*, 1982b). Estos datos sugieren que DYN-A₂₋₁₇ es un péptido no opioide que tiene efectos excitatorios.

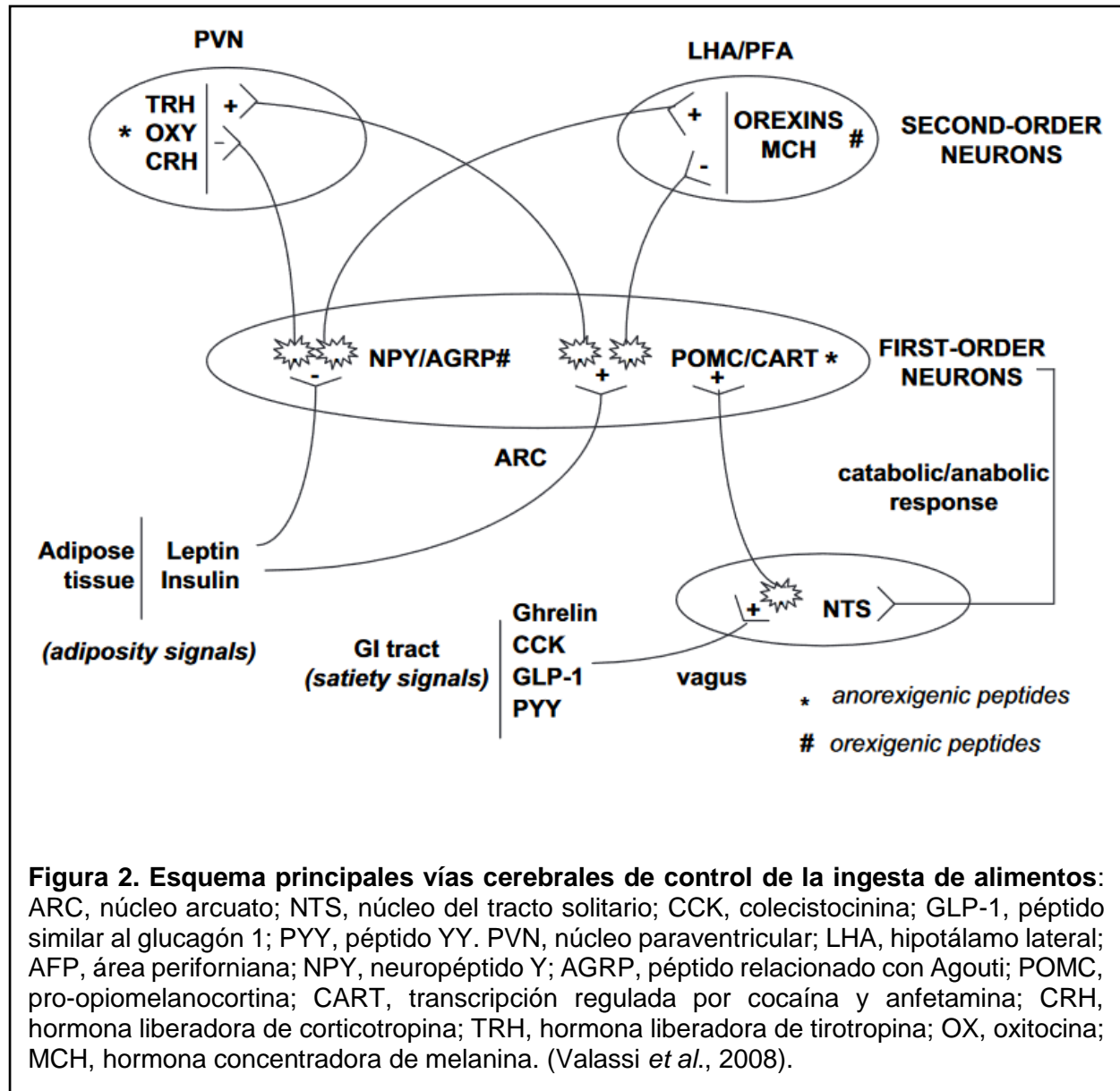
La evidencia acerca del rol fisiológico de DYN-A₂₋₁₇ es escasa. En roedores, DYN-A₂₋₁₇ participa en la regulación de dolor, la ingesta de líquidos y la regulación térmica (Walker *et al.*, 1982b; Cavicchini *et al.*, 1989; Shukla y Lemaire, 1992; Tsushima *et al.*, 1993; Vanderah *et al.*, 1996). Si bien el receptor de DYN-A₂₋₁₇ en el sistema nervioso central es desconocido, los candidatos propuestos incluyen al receptor de bradiquinina y NMDA. Estudios han demostrado que existe una moderada afinidad entre los receptores de bradiquinina y péptidos no opioides derivados de DYN-A. La inyección intratecal en ratas de HOE-140, antagonista selectivo del receptor 2 de bradiquinina (B2), bloquea la hiperalgesia inducida por la inyección intratecal del péptido DYN-A₂₋₁₃ no opioide. Además, la administración de DYN-A₂₋₁₃ intratecal en ratas no induce hiperalgesia en ratones transgénicos que carecen del receptor B2 de bradiquinina (Lai *et al.*, 2008). Con respecto al receptor NMDA, DYN-A₂₋₁₇ tiene una alta afinidad por el sitio de unión del receptor NMDA en cultivos primarios de neuronas corticales de rata (Tang *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000), DYN-A₂₋₁₇ potencia transitoriamente corrientes mediadas por el receptor NMDA (Lai *et al.*, 1998) y los efectos de excitotoxicidad neuronal provocados por DYN no opioide son bloqueados por antagonistas de los receptores NMDA (Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, DYN-A₂₋₁₇ aumenta el calcio intracelular en cultivos de neuronas corticales de forma independiente a la función del receptor de NMDA (Tang *et al.*, 2000). En resumen, a pesar de que DYN-A₂₋₁₇ interactúa con los receptores NMDA y bradiquinina, no es claro si estos receptores de membrana median los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en neuronas del sistema nervioso central.

3.4. Control hipotalámico de la ingesta de alimento.

La ingesta de alimentos está regulada por un complejo sistema de señales centrales y periféricas. La regulación periférica incluye señales de saciedad y señales de adiposidad. Las señales de saciedad como colecistoquinina (CCK), el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido YY (PYY) se originan en el tracto gastrointestinal (GI) en el periodo post-prandial y, a través del nervio vago envían información al núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco cerebral caudal. Las fibras aferentes del NTS proyectan al núcleo arcuato (ARC) ubicado en el hipotálamo, donde las señales de saciedad se integran con las señales de adiposidad (leptina e insulina), y se conectan hacia otras neuronas del hipotálamo, creando así una compleja red de circuitos neuronales que controlan la respuesta de un individuo frente a una comida. El hipotálamo es la principal zona del cerebro involucrada en la regulación de la homeostasis. Está compuesto de múltiples regiones y subtipos neuronales, integrando información acerca del estado nutricional del organismo para regular conductas y procesos fisiológicos asociados al consumo de alimentos (Valassi *et al.*, 2008).

En el hipotálamo existen distintos núcleos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos. El núcleo ARC, que se encuentra adyacente al tercer ventrículo contiene dos grupos interconectados de neuronas, un grupo de neuronas libera el neuropéptido Y (NPY) y el péptido AGRP, provocando el aumento en la ingesta de alimentos (Atasoy *et al.*, 2012), y las neuronas pro-opiomelanocortina (POMC) y CART provocan una disminución en la ingesta de alimentos. Los axones de estas neuronas proyectan al núcleo paraventricular (PVN), donde se secretan las sustancias anorexigénicas hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) o factor liberador de corticotropina (CRF) y oxitocina, y en parte al hipotálamo lateral (LH), donde se produce la hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas. Cuando las señales de adiposidad alcanzan ARC, se liberan péptidos anorexigénicos que activan un circuito catabólico. Por el contrario, la activación de la vía anabólica conduce a la liberación de péptidos orexigénicos y ocurre cuando las concentraciones de leptina o

insulina en el cerebro son bajas, lo que indica la urgencia de reponer las reservas de combustible (Valassi *et al.*, 2008).

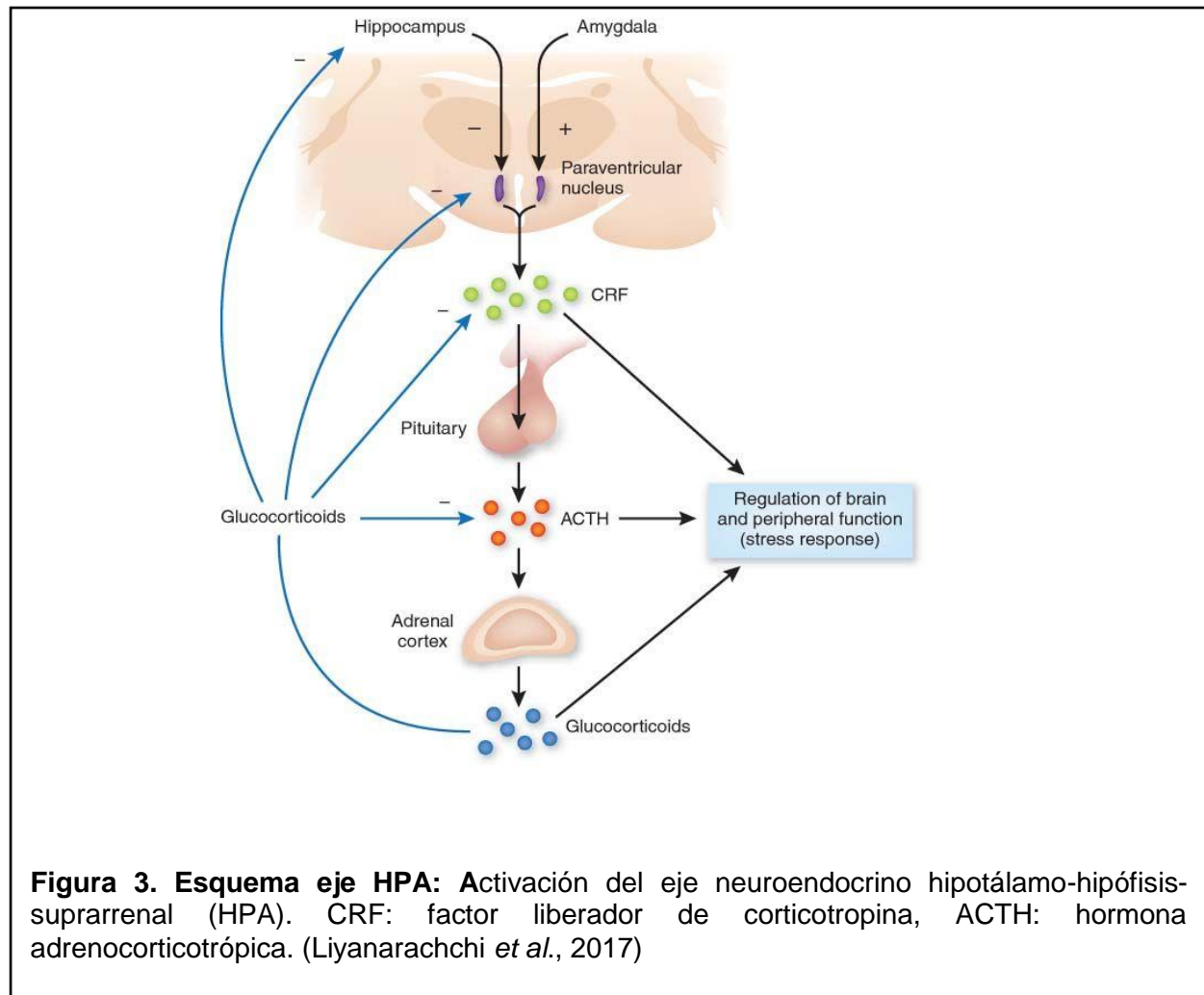


3.4.1. El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN): Su rol en homeostasis y alimentación.

PVN es un núcleo ubicado dentro del hipotálamo que está involucrado en el control de distintas funciones homeostáticas, incluyendo estrés y la ingesta de alimentos. Antecedentes muestran que lesiones en PVN provocan hiperfagia y obesidad (Leibowitz *et al.*, 1981). En PVN se existen diferentes poblaciones neuronales, como las neuronas productoras de CRF, las neuronas productoras de oxitocina y TRH (Valassi *et al.*, 2008). CRF es una hormona peptídica que actúa como neurotransmisor y está involucrado en la respuesta al estrés, se sintetiza principalmente en PVN y en el núcleo ventromedial (VMH). Tiene una alta potencia anorexigénica en condiciones de estrés, y en ratones expuestos a ayuno prolongado tiene un efecto atenuador del apetito (Valassi *et al.*, 2008). El rol más clásico de CRF es la activación del eje HPA, el cual tiene un rol clave en la respuesta fisiológica a estrés. Un estímulo estresor activa las neuronas productoras de CRF en PVN, lo que conduce a la secreción de CRF en la eminencia media, y estimula la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la glándula pituitaria. A su vez, la ACTH actúa sobre la corteza suprarrenal para liberar glucocorticoides, los que tienen una variedad de efectos que incluyen aumentos en la glicemia y el peso corporal (Cabral *et al.*, 2012) **(Figura 3)**. Además de su rol en estrés, CRF tiene un papel central en la regulación del apetito agudo en condiciones de estrés. En ARC inhibe la acción de NPY y AGRP, principales impulsores de la ingesta de alimentos, por lo tanto, CRF en estrés agudo inhibe el apetito (Sominsky & Spencer, 2014). Sin embargo, en dosis bajas es capaz de aumentar el consumo de alimentos (Krhan *et al.*, 1988; Monnikes *et al.*, 1992).

La oxitocina es un péptido sintetizado dentro de las neuronas de PVN y además por las neuronas del núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo (Blevins & Ho, 2013). La administración central y periférica de oxitocina reduce la ingesta de alimentos y el peso corporal. Oxitocina tiene un efecto anorexigénico; un ejemplo es que ratones con

haploinsuficiencia de SIM1, que es un factor de transcripción clave en la maduración de neuronas que conforman PVN, tiene una expresión disminuida de oxitocina y presentan un fenotipo hiperfágico y obeso comparado con ratones control. Además, en modelos animales del síndrome de Prader-Willi existe una reducción en el número y tamaño de neuronas que expresan oxitocina en PVN además ser hiperfágicos con comparación con ratones control (Morton *et al.*, 2012). Finalmente, la administración de TRH y de sus análogos por diferentes vías inhibe la ingesta de alimentos de manera significativa, sin embargo, su efecto es más potente cuando se administra por vía intracerebroventricular (Choi *et al.*, 2002).



3.5. Rol del péptido no opioide DYN-A₂₋₁₇ en control de alimentación y actividad física e interacción con neuropéptidos de orexina

Diferentes líneas de evidencia muestran que los neuropéptidos DYN opioides promueven la ingesta de alimentos a través de su acción en diversos sitios del cerebro, incluyendo PVN (Gosnell *et al.*, 1986; Ikeda *et al.*, 2015). Nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que la inyección DYN-A₂₋₁₇ en PVN en ratones adultos aumenta la ingesta de alimento estándar (*chow*) (Gac *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018), lo que sugiere un rol de los neuropéptidos DYN no opioides en regulación de la ingesta de alimentos.

Una revisión de la literatura sugiere que una fuente de los neuropéptidos DYN en PVN son las neuronas de orexina/dinorfina, localizadas en el hipotálamo lateral (LH). Aproximadamente el 96% de las neuronas de orexina co-produce y liberan neuropéptidos DYN (Chou *et al.*, 2001; Muschamp *et al.*, 2014) y existe evidencia que indica que estas neuronas proyectan (envían axones) a PVN (Peyron *et al.*, 1998) y que estas proyecciones son monosinápticas (Dergacheva *et al.*, 2017). Existen dos tipos de neuropéptidos de orexina (orexina-A, OXA, y orexina-B, OXB) (de Lecea *et al.*, 1998) cuyos efectos biológicos son mediados a través de dos receptores acoplados a proteína G (OXR1 y OXR2), donde OXA tiene mayor afinidad por el receptor OXR1 mientras que OXB tiene igual afinidad por ambos receptores (Sakurai *et al.*, 1998). Los neuropéptidos de orexina promueven la ingesta de alimentos y la actividad física espontánea (SPA) (Kotz, 2006). Sin embargo, aunque estos neuropéptidos promueven la ingesta de alimentos, la activación de las neuronas de orexina conduce a un balance negativo de energía, en gran parte debido al aumento de SPA y su gasto energético asociado (Perez-Leighton *et al.*, 2012, Kotz *et al.*, 2012).

En PVN, orexina y péptidos DYN opioides pueden aumentar por separado la ingesta de alimento y actividad física (Gosnell *et al.*, 1986b; Dube *et al.*, 1999; Kiwaki *et al.*, 2004) y la inyección conjunta de DYN-A₂₋₁₇ y OXA en PVN en ratones potencia sus efectos individuales en la ingesta de alimentos (Gac *et al.*, 2016), lo que sugiere que OXA y DYN-A₂₋₁₇ podrían tener mecanismos de acción similares dentro de PVN.

3.6. CRF como posible mediador de efectos de DYN-A₂₋₁₇ en PVN

Como se mencionó anteriormente, en PVN existen diversos neuropéptidos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos. Entre estos se encuentra CRF, neuropéptido que en condiciones de estrés agudo inhibe el apetito (Sominsky & Spencer, 2014), pero que en dosis bajas es capaz de aumentar el consumo de alimentos (Krhan *et al.*, 1988; Monnikes *et al.*, 1992). Por lo tanto, el efecto de CRF en ingesta de alimentos parece depender del nivel de actividad de las neuronas de CRF y/o de la producción de CRF por neuronas de PVN.

La evidencia actual apoya la hipótesis de que CRF medie los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en PVN. Esta hipótesis se respalda por datos que indican que la inyección en PVN de orexina-A aumenta la actividad de las neuronas de CRF (Kuru *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2004) y su activación puede inducir la liberación local de CRF en PVN (Imaki *et al.*, 1996; Mansi *et al.*, 1996; Dabrowska *et al.*, 2013). Además, la administración central de orexina-A puede aumentar la activación de neuronas de CRF que conlleva a un aumento de ACTH en plasma (Al-Barazani y col., 2001; Russell *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2005).

Estos antecedentes, junto con el hecho de que existe una co-producción y co-liberación de neuropéptidos DYN y orexina desde neuronas de orexina del hipotálamo lateral hacia PVN (Chou *et al.*, 2001; Muschamp *et al.*, 2014; Peyron *et al.*, 1998) y que la administración de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumenta la ingesta de alimentos y su coinyección con orexina potencia este efecto (Dube *et al.*, 1999; Kiwaki *et al.*, 2004; Gac *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018), sugieren mecanismos similares de acción dentro de PVN, pero si los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos implican la regulación de la actividad de CRF en PVN sigue sin estar claro.

3.7. Planteamiento del problema

La familia de los DYN regula múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la ingesta de alimentos. Clásicamente, los neuropéptidos DYN actúan a través de receptores acoplados a proteína G de la familia opioide. Sin embargo, existen neuropéptidos DYN que no actúan a través de receptores opioides, sobre los cuales existe limitada evidencia acerca de sus funciones fisiológicas. Nuestro grupo demostró que el neuropéptido no opioide DYN-A₂₋₁₇ aumenta la ingesta de alimentos a través de su acción en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Sin embargo, los mecanismos neuronales que median este efecto de DYN-A₂₋₁₇ no han sido estudiados. El **objetivo** central de esta tesis fue investigar los mecanismos neuronales de acción de DYN-A₂₋₁₇ en PVN que median sus efectos en la ingesta de alimentos. La **importancia** de este estudio se basa en la identificación de mecanismos biológicos que contribuirán en entender la regulación de la alimentación y del balance energético facilitando el diseño de posibles terapias para el tratamiento de patologías de trastornos de alimentación.

3.8. Hipótesis

El neuropéptido no opioide DYN-A₂₋₁₇ aumenta la ingesta de alimento activando neuronas que expresan el neuropéptido CRF en PVN.

3.9. Objetivo General

Determinar los mecanismos neuronales de acción de DYN-A₂₋₁₇ en PVN que median sus efectos en ingesta de alimento.

3.10. Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar si el bloqueo de receptores de CRF en el cerebro disminuye los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos.
- 2.- Analizar si DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas del PVN, incluyendo las neuronas que expresan CRF.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Modelo animal para estudio

En estos experimentos se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/C (20-25g y 7-12 semanas de edad), adquiridos del Instituto de Salud Pública (Santiago, Chile). Todos los ratones fueron aclimatados a un ciclo de luz-oscuridad 12/12 h (luz entre 7:00 y 19:00 horas) a temperatura entre 20-25°C. Los ratones tuvieron acceso libre a agua y comida estándar (*chow*) (5P00-Prolab RMH-3000, Lab Diets, USA; porcentaje de kilocalorias: 14.3% Grasa; 25.9% Proteínas; 59.8% Hidratos de Carbono). Todos los ratones fueron eutanasiados por decapitación después de la anestesia con exceso de isoflurano (Baxter, EEUU). Todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por el comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello.

4.2. Cirugía e implantación de cánula

Para la implantación de cánula los animales fueron anestesiados con gas isoflurano (Baxter, TX, EE.UU., 5% de inducción y 1% de mantenimiento) e implantados con una cánula de acero inoxidable (calibre 28, Plásticos Uno, VA, EE.UU.) dirigida a PVN (coordenadas estereotáxicas relativas a bregma: -0,9 mm rostral, -0.2 mm lateral, 3,6 mm debajo de la superficie del cráneo) al lado derecho del cerebro (Perez-Leighton *et al.*, 2012). La atención postoperatoria incluyó tres inyecciones de ketoprofeno (2.5 µg/kg),

una inmediatamente después de la finalización de la cirugía y después cada 24 h. Los animales tuvieron un período de recuperación de una semana después de la cirugía, en jaulas individuales con acceso libre a *chow* y agua.

4.3. Péptidos

DYN-A₂₋₁₇ (Bachem, Torrence, CA, USA), DYN-A₁₋₁₃ (Bachem, USA), α CRF₉₋₄₁ (Tocris, USA) fueron disueltos en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF; NaCl 150 mM, KCl 3 mM, CaCl₂·2H₂O 1.4 mM, MgCl₂·6H₂O 1.7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 1.5 mM, NaH₂PO₄·7H₂O 0.22 mM, todos químicos de Winkler, Chile). Todos los péptidos fueron alicuotados y guardados a -80°C hasta su uso.

4.4. Inyecciones

Las inyecciones se realizaron entre las 09:00 y las 11:00 AM. Los ratones fueron inyectados con aCSF una vez al día durante tres días consecutivos para aclimatarlos al procedimiento de inyección. DYN-A₂₋₁₇ y DYN-A₁₋₁₃ se inyectaron en un volumen de 0.25 μ L durante 30 s y se dejó el inyector dentro de la cánula 30 s post-inyección para la correcta difusión del péptido. α -helical CRF₉₋₄₁ se inyectó en un volumen de 0.5 μ L durante 1 min y se dejó el inyector dentro de la cánula 1 min post-inyección para la correcta difusión del péptido.

4.5. Medición de ingesta de alimentos

La ingesta de alimentos se calculó como el alimento consumido corregido por el *spillage*, que corresponde al alimento que fue molido y masticado por el animal, pero no consumido.

4.6. Preparación de tejido para inmunohistoquímica

Para la detección de FOS y CRF por inmunohistoquímica en respuesta a la inyección de DYN-A₂₋₁₇, 2 h post inyección los ratones fueron perfundidos vía intracardiaca con 50 mL de paraformaldehído (PFA) 4% (pH=7.0) (EDM Millipore, USA), disuelto en tampón fosfato salino (PBS 1X, pH=7.4, Winkler, Chile), y post-fijados por 24 h con la misma solución. A continuación, los cerebros fueron crioprotegidos en un gradiente de sacarosa (Winkler, Chile) usando incubaciones en concentraciones crecientes (10%, 20%, 30% p/v en PBS 1X pH=7.4) y se obtuvieron cortes coronales de 36 µm en criostato.

4.7. Tinción de Nissl con tionina para confirmación de posicionamiento de cánula

Para verificar la correcta colocación de la cánula en PVN se tomaron distintos cortes del eje antero-posterior del cerebro de acuerdo a un atlas de referencia (Franklin, 2013) y se realizó la tinción con tionina 0.1% a partir de un protocolo estándar de tinción para posicionamiento de cánula (**Tabla 1**). Se obtuvieron 25 a 30 cortes distribuidos en 5 portaobjetos gelatinizados (0.1% Gelatina cerdo Tipo B (Sigma, USA), sulfato crómico potásico 10 g/L (Winkler, Chile) con 5 muestras cada uno y montados con Entellan. Además de la correcta posición de la cánula se observó la posible presencia de sangre en los cortes lo que es indicativo de lesiones en el tejido.

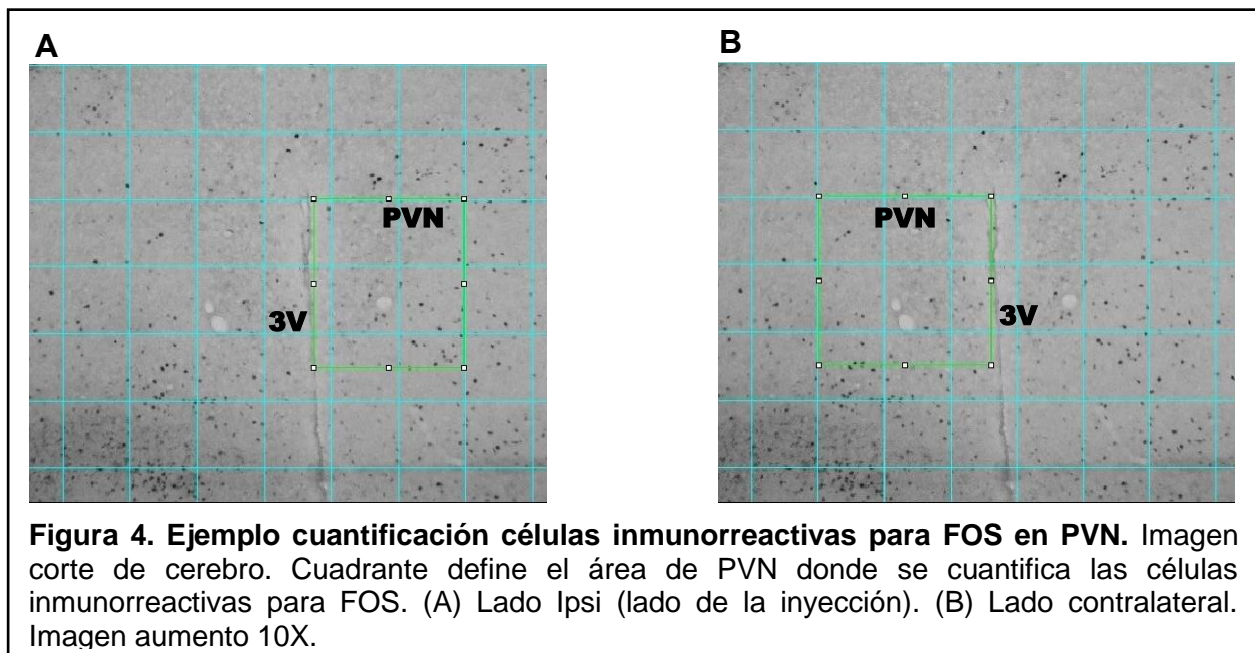
4.8. Inmunohistoquímica para FOS

La inmunohistoquímica se realizó a partir de un protocolo estándar (**Tabla 2**). Los cortes coronales fueron lavados con PBS 1X luego con buffer PBS1X Triton X-100 0.3% (PBST). El bloqueo de proteínas se realizó usando solución albumina de suero bovino 3% (BSA) en PBST durante 1 h. Tras el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario anti c-FOS generado en conejo (SC-52, Santa Cruz Biotechnology 1:500) diluido en una solución de

BSA 1% PBST toda la noche. Posterior al período de incubación con el anticuerpo primario los cortes de cerebro fueron lavados con PBS 1X. Después, se trataron las secciones con anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado generado en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA 1:500), diluido en una solución de BSA 1% en PBST durante 90 min, posteriormente se trataron los cortes con el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 h, de acuerdo con los protocolos del fabricante, lo que permite la amplificación de la señal del anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se realizó la incubación con el cromógeno 3-39-diaminobencidina (DAB) / Níquel durante 10 min, dando un precipitado negro/morado. Finalmente se realizó el montaje de las muestras para su posterior visualización.

4.9. Cuantificación de células inmunorreactivas para FOS

La cuantificación de las células inmunorreactivas para FOS se realizó mediante el programa ImageJ. Primeramente, se midió el largo total del tercer ventrículo (3V) y luego desde la mitad de este se estableció un cuadrante al lado derecho del ventrículo (Lado de la inyección o Ipsi) y al lado izquierdo del ventrículo (Contralateral), lo que definió el área a cuantificar que correspondía a PVN.



4.10. Estandarización detección de CRF por inmunohistoquímica en tejido

Para la detección de CRF por inmunohistoquímica en primer lugar ratones recibieron una infusión de colchicina 10 µg/µl (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) intracerebroventricular (i.c.v) 24 h antes de la perfusión transcárdial para maximizar el contenido de péptido de CRF en cuerpos de células neuronales (Dabrowska *et al.*, 2011).

Posterior a las 24 h, todos los ratones fueron perfundidos con PFA al 4% (pH = 7.0) y el procedimiento subsiguiente de fijación y corte de cerebro se realizó como se ha descrito anteriormente. La inmunohistoquímica se realizó a partir de un protocolo estándar (**Tabla 2**). Los cortes coronales fueron lavados con PBS 1X luego con buffer PBS mas Triton X-100 0.3% (PBST). El bloqueo se realizó usando solución albumina de suero bovino 3% (BSA) en PBST durante 1 h. Tras el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario anti-CRF generado en cabra (SC-1759; Santa Cruz Biotechnology) diluido en una solución de BSA 1% PBST toda la noche. Posterior al período de incubación con el anticuerpo primario los cortes de cerebro fueron lavados con PBS. Después, se trataron las secciones con anticuerpo secundario conejo anti cabra biotinilado 1:500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), diluido en una solución de BSA 1% en PBST durante 90 minutos, posteriormente se trataron los cortes con el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 h, de acuerdo con los protocolos del fabricante, lo que permite la amplificación de la señal del anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se realizó la incubación con el cromógeno 3-39-diaminobencidina (DAB) / Níquel durante 10 min, dando un precipitado negro/morado. Finalmente se realizó el montaje de las muestras para su posterior visualización.

La estandarización del protocolo para la detección de CRF en PVN consistió en utilizar diferentes concentraciones de colchicina 40 µg/µl, 20 µg/µl y 10 µg/µl. Además, se usaron diferentes tiempos de incubación con el anticuerpo primario 24 h, 48 h y 72 h y diferentes diluciones de este 1:250 y 1:500 diluido en solución de BSA 1%.

4.11. Análisis estadísticos

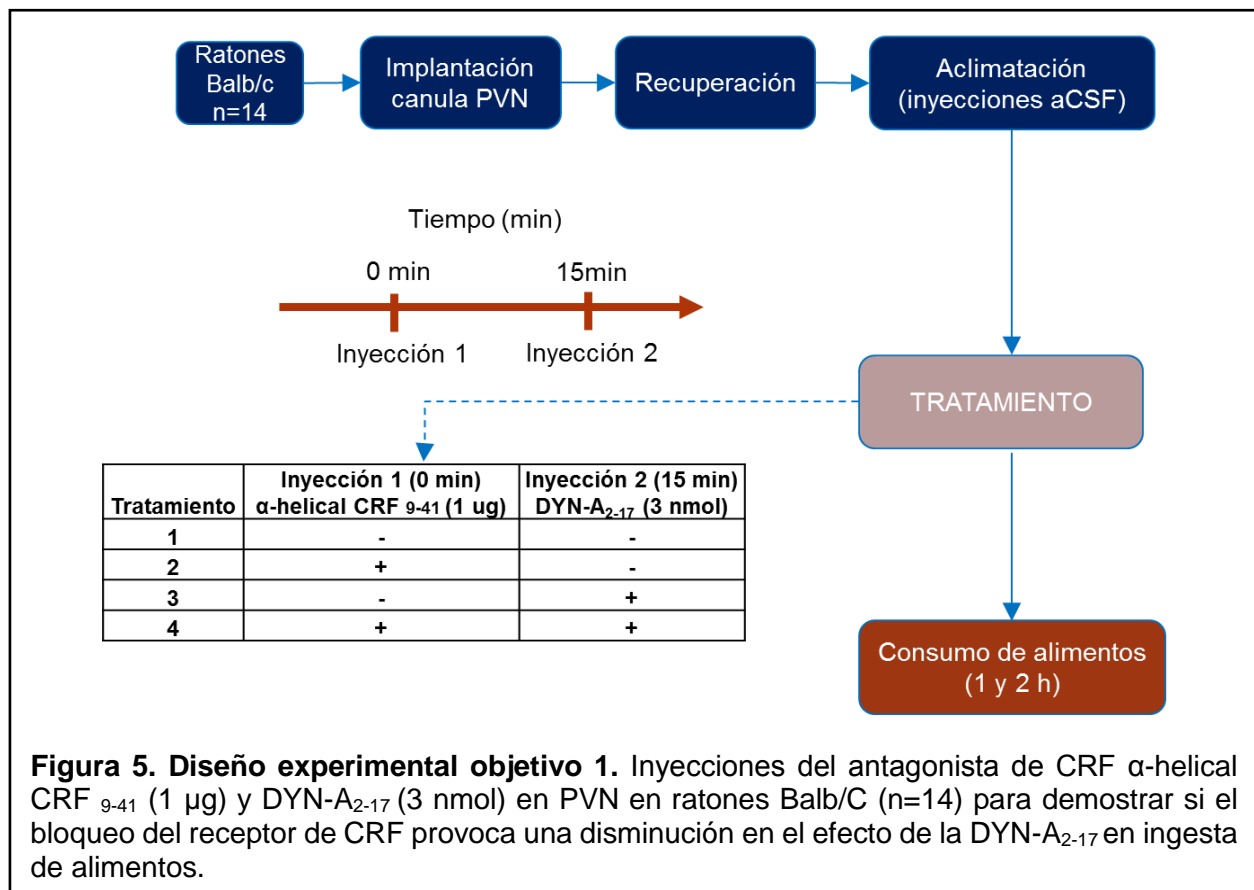
Todos los datos se expresan como media \pm SEM. La significancia estadística se estableció en $P < 0.05$. El efecto de α CRF₉₋₄₁ en la ingesta de alimentos causada por DYN-A₂₋₁₇ se analizó con un ANOVA de medidas repetidas con dosis de DYN-A₂₋₁₇ y α CRF₉₋₄₁ como variables independientes y ratones como medida repetida. El efecto de DYN-A₂₋₁₇ en la activación neuronal de FOS y la concentración plasmática de ACTH se analizó con test de t de student no pareado con dosis de DYN-A₂₋₁₇ y aCSF como variables independientes y ratones como medida repetida.

5. Diseño experimental

5.1. Experimento 1: Efectos del bloqueo de receptores de CRF en la acción de DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimento.

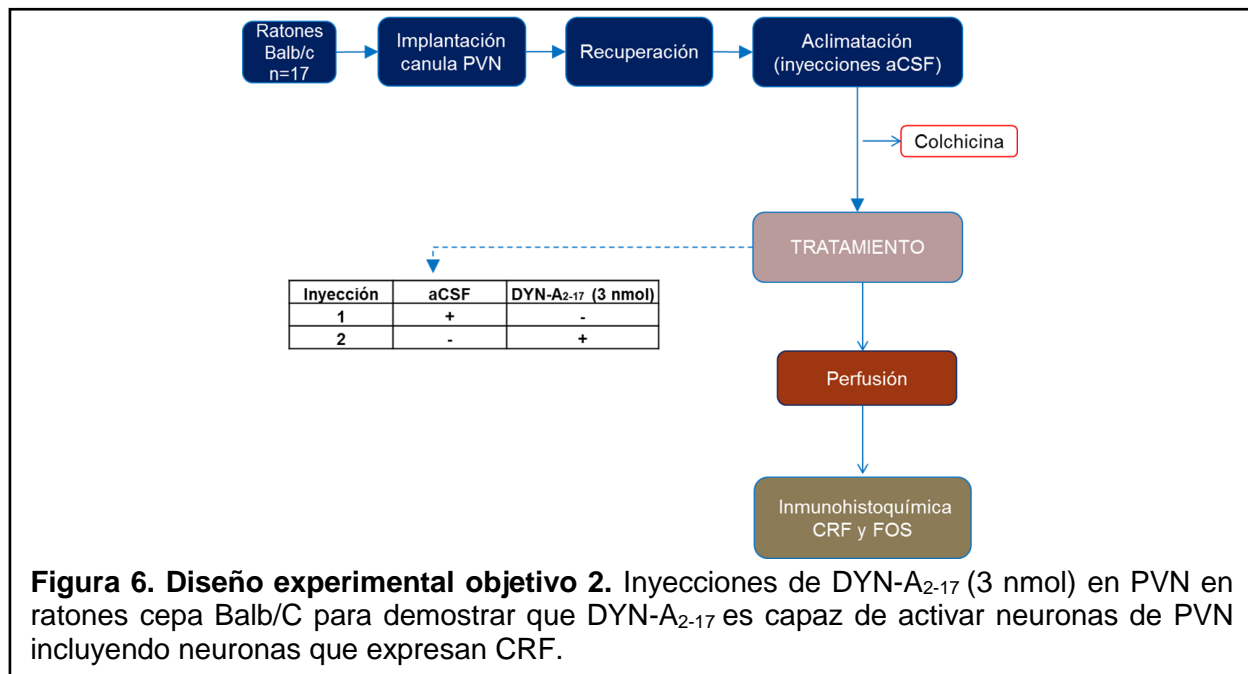
Ratones Balb/c canulados apuntado a PVN (n=14) fueron aclimatados a jaulas individuales con viruta de papel (papel filtro y papel secante), material de enriquecimiento (tubo de PVC), con acceso libre a *chow* y agua durante una semana. El uso de viruta de papel es fundamental en estos experimentos para recuperar el *spillage* y medir de forma apropiada el consumo de alimentos. Posterior a este período de recuperación post-cirugía, los ratones fueron aclimatados al procedimiento de inyección intra-cánula recibiendo 2 inyecciones de aCSF en PVN separadas por 15 minutos por 3 días consecutivos. A continuación, los ratones se inyectaron en PVN con las combinaciones de α CRF₉₋₄₁ (0, 1 μ g) y 15 min después DYN-A₂₋₁₇ (0, 3 nmol) usando un diseño de medidas repetidas, es decir todos los ratones recibieron todos los tratamientos, de forma aleatoria, con 48 h entre los días de inyección. Las dosis de α CRF₉₋₄₁ se basó en un reporte previo (Krahn *et al.*, 1986). Se midió la ingesta de alimentos 1 y 2 h después de la segunda inyección y se corrigió por *spillage* (**Figura 5**).

En cada día de inyección, 1.5 h antes de las inyecciones los ratones fueron colocados en jaulas individuales vacías sin acceso a comida ni agua y se mantuvieron en ellas por 2 h post-inyección y después devueltos a sus jaulas normales. Después de completar el experimento, los ratones fueron inyectados con DYN-A₁₋₁₃ (3 nmol) o aCSF y la ingesta de alimentos se registró 2 h después de la inyección. Los datos de 4 ratones fueron descartados ya que no presentaron aumento en la ingesta de alimentos al ser inyectados con DYN-A₁₋₁₃ y los datos de un ratón fueron descartados debido a la incorrecta colocación de la cánula, verificada por los métodos histológicos (Perez-Leighton *et al.*, 2012). No se observaron lesiones en los cortes de cerebro, por lo tanto, no se eliminaron ratones por este motivo. El tamaño final de la muestra para el análisis fue de 9 ratones.



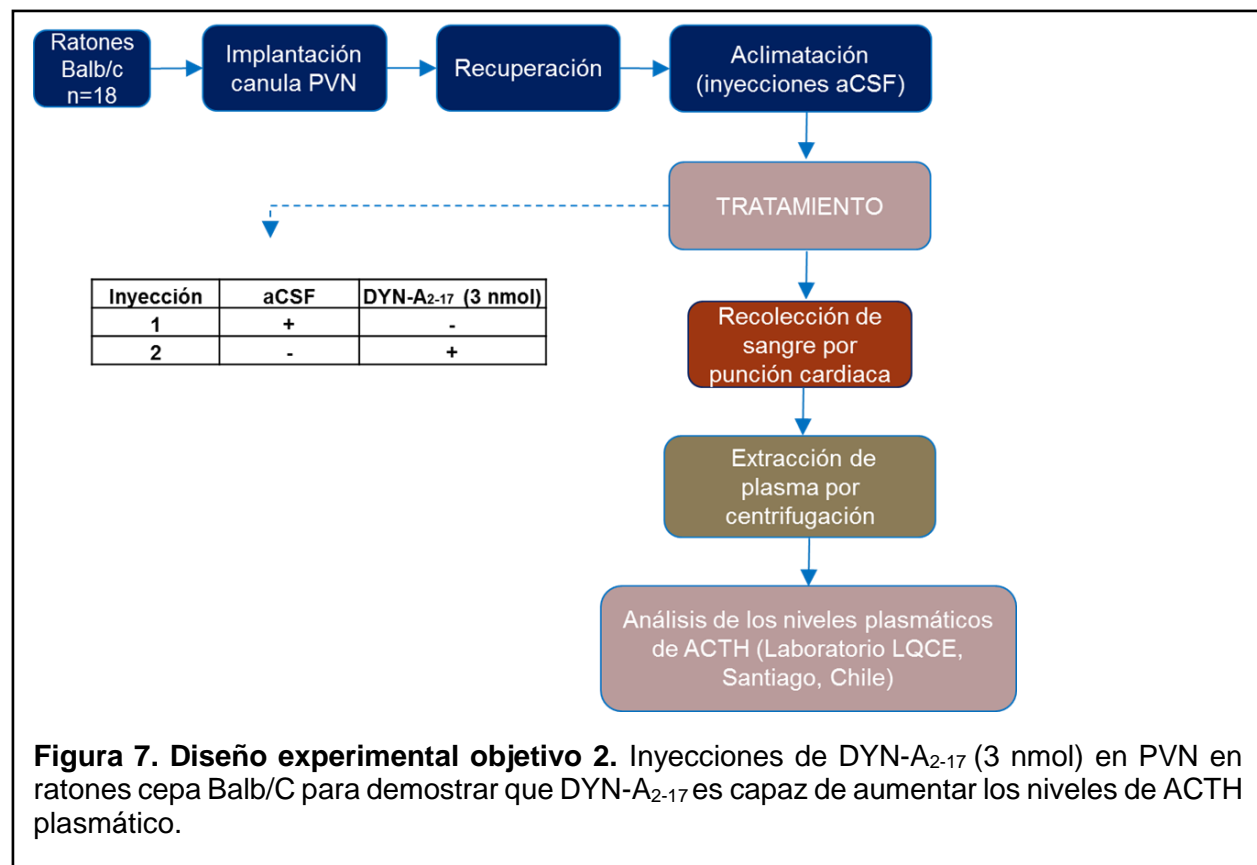
5.2. Experimento 2: Demostrar que DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas en PVN incluyendo neuronas que expresan CRF.

Ratones Balb/c canulados apuntado a PVN (n = 17) posterior a la cirugía fueron colocados en jaulas individuales con viruta de coronta de choclo y material de enriquecimiento, con acceso libre a alimento (*chow*) y agua durante una semana. Posterior a este período de recuperación postcirugía ratones fueron aclimatados al procedimiento de inyección recibiendo una inyección de aCSF en PVN por 3 días consecutivos. A continuación, los ratones se inyectaron con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol, n = 9) o aCSF (n = 8) en PVN. 90 min después de la inyección se realizó la perfusión de los ratones mediante la técnica de perfusión miocárdica y el tejido de PVN fue preparado para inmunohistoquímica de FOS y CRF (**Figura 6**). En cada día de inyección, los ratones fueron colocados en jaulas individuales por 1.5 h antes de las inyecciones para su aclimatación. La posición de la cánula fue verificada por métodos histológicos (Perez-Leighton *et al.*, 2012). No se observaron lesiones en los cortes de cerebro, por lo tanto, no se eliminaron ratones por este motivo. Tras la confirmación de la correcta colocación de las cánulas se mantuvo el tamaño inicial de 17 ratones para el análisis.



5.3. Experimento 3: Efecto de DYN-A₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático.

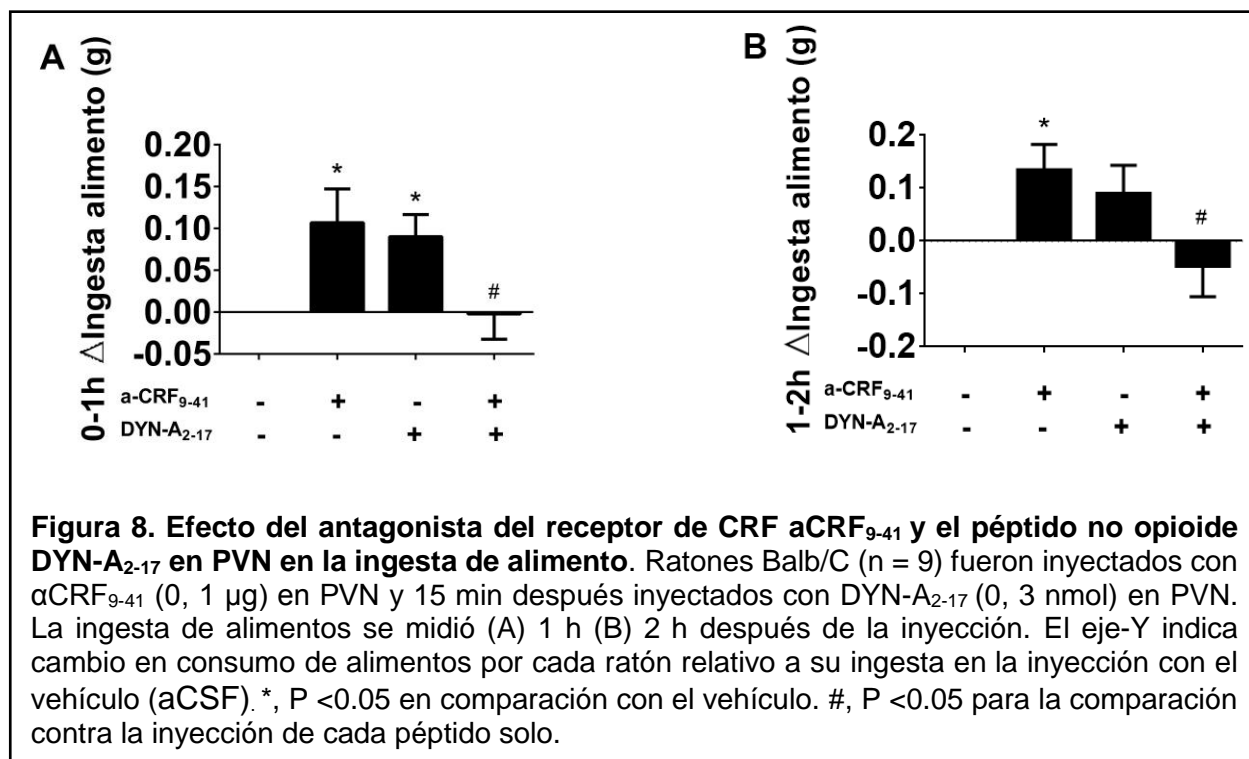
Ratones canulados apuntando a PVN (n = 18) fueron aclimatados al procedimiento de inyección durante 3 días consecutivos con una sola inyección diaria de aCSF. A continuación, se inyectaron con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol, n = 8) o aCSF (n = 10) en PVN. Los ratones se aclimataron durante 1.5 h antes de las inyecciones a una jaula vacía con acceso libre a alimentos y agua. Una hora después de la inyección, se recogió una muestra de sangre (1 ml) por punción cardíaca en tubos de recolección de EDTA K3 (Valtek, Santiago, Chile). El plasma se extrajo inmediatamente por centrifugación (2500 rpm por 10 min), y se guardó en alícuotas a -80 ° C hasta el análisis de los niveles plasmáticos de ACTH en un laboratorio comercial (Laboratorio LQCE, Santiago, Chile) (**Figura 7**). La posición de la cánula fue verificada por métodos histológicos (Perez-Leighton *et al.*, 2012).



6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1: α CRF₉₋₄₁ antagonista del receptor de CRF bloquea los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimentos.

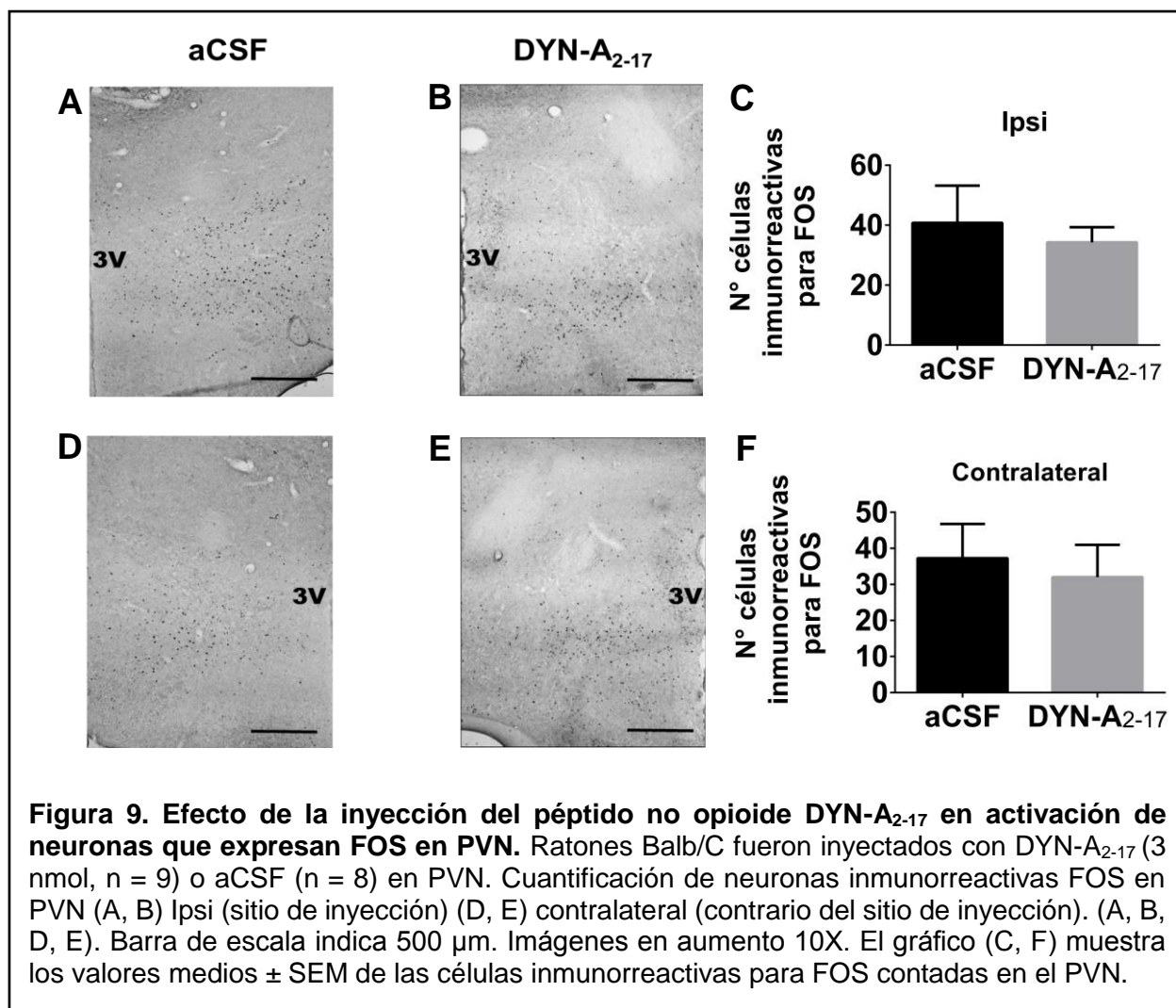
Para examinar si la señalización por CRF en PVN contribuye a los efectos DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimentos, se inyectó α CRF₉₋₄₁ (antagonista selectivo del receptor 2 de CRF) o aCSF en PVN 15 minutos antes de la inyección de DYN-A₂₋₁₇ o aCSF en PVN (**Figura 5**). Al ser un diseño de medidas repetidas, los datos se normalizaron dentro de cada ratón, restando el consumo de alimentos en respuesta a la inyección de solo aCSF. Un análisis separado de la ingesta de alimentos durante la primera y la segunda h después de la inyección de DYN-A₂₋₁₇ con un ANOVA de medidas repetidas mostró que no hubo efectos significativos de DYN-A₂₋₁₇ (1h :F (1,8) = 1.48, P = 0.26; 2h: F (1,8) = 0.01, P = 0.94) o α CRF₉₋₄₁ (1h: F (1,8) = 0.56, P = 0.46; 2h: F (1,8) = 0.88, P = 0.37), pero su interacción fue significativa para 1 h (F (1,8) = 11.45, P = 0.01) y 2h (F1,8 = 10.62, P = 0.01). La inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumentó la ingesta de alimentos medida a 1 h, pero no 2 h después de la inyección mientras que α CRF₉₋₄₁ aumentó significativamente la ingesta de alimentos a 1 y 2 h después de la inyección en comparación con aCSF. Sin embargo, α CRF₉₋₄₁ seguido de DYN-A₂₋₁₇ bloqueó sus efectos individuales en la ingesta de alimentos (**Figura 8**). Estos datos muestran que el efecto de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos en PVN estaría mediado por la activación de los receptores de CRF en PVN.



6.2. Experimento 2: Efecto de DYN-A₂₋₁₇ en activación de neuronas de PVN incluyendo CRF.

6.2.1. Efecto de DYN-A₂₋₁₇ en activación de neuronas que expresan FOS.

Para determinar si DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas del PVN, ratones Balb/c canulados fueron inyectados con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol) o aCSF (vehículo) en PVN y luego se realizó inmunohistoquímica para el marcador de actividad neuronal FOS (**Figura 6**). Si bien se obtuvo marcaje para FOS usando esta técnica (**Figura 9**), no se observó una diferencia significativa entre el número de células inmunorreactivas para FOS entre el grupo control (aCSF) y el inyectado con DYN-A₂₋₁₇ ya sea en el lado donde se realizó la inyección (IPSI o lado derecho del cerebro) o el contralateral (**Figura 9**). Esto sugiere que DYN-A₂₋₁₇ no aumenta de forma significativa el número de neuronas inmunorreactivas para FOS en PVN.



6.2.2. Efecto de DYN-A₂₋₁₇ en activación neuronal de CRF.

Para analizar si el péptido DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas de CRF del PVN, ratones Balb/c canulados fueron inyectados con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol) o aCSF (vehículo) en PVN para identificar neuronas de CRF mediante inmunohistoquímica (**Figura 6**) y medir activación neuronal por medio de la expresión de Fos. No fue posible obtener marcaje para CRF mediante inmunohistoquímica, lo que impidió analizar directamente si las neuronas de CRF son activadas por DYNA₂₋₁₇ en PVN.

6.2.3. Efecto de DYN-A₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático

A partir del resultado negativo del marcaje de CRF en PVN y para analizar si efectivamente DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas de CRF en PVN se analizó la concentración de ACTH plasmático en ratones Balb/c canulados inyectados con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol) o aCSF (vehículo) en PVN (**Figura 7**), ya que la activación de neuronas de CRF en PVN causa un aumento en los niveles de ACTH plasmático (Al-Barazanji *et al.*, 2001). Los resultados indican que DYN-A₂₋₁₇ causó un aumento significativo en los niveles de ACTH plasmático en comparación con el grupo control (**Figura 10**, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas de CRF en PVN, causando una activación del eje HPA.

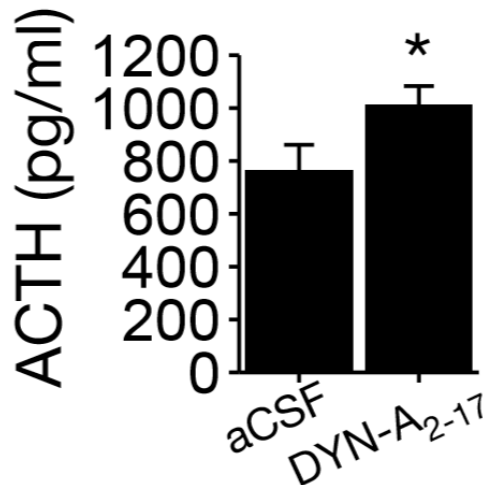


Figura 10. Efecto de la inyección del péptido no opioide DYN-A₂₋₁₇ en PVN en los niveles de ACTH plasmático. Ratones Balb/C fueron inyectados con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol, $n = 8$) o aCSF ($n = 10$) en PVN y las concentraciones de ACTH en plasma se midieron 1 h después de la inyección. *, $P < 0.05$ para comparación contra aCSF.

7. DISCUSION

Para evaluar si el aumento en consumo de alimentos causado por DYN-A₂₋₁₇ en PVN dependen de la señalización de CRF en este núcleo del cerebro, se analizó si la inyección en PVN de α CRF₉₋₄₁ (antagonista del receptor 2 de CRF) disminuye la ingesta de alimentos estimulada por DYN-A₂₋₁₇ en PVN, si DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas que expresan CRF en PVN y si DYN-A₂₋₁₇ aumenta la concentración de ACTH plasmática, lo que sería consistente con la activación de neuronas que expresan CRF en PVN.

Nuestros datos muestran que la inyección de α CRF₉₋₄₁ en PVN aumentó la ingesta de alimento y bloqueó los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimento. Con respecto al efecto de DYN-A₂₋₁₇ en la activación neuronal en PVN, los resultados no muestran que la inyección de DYN-A₂₋₁₇ aumente de forma significativa la expresión de FOS en neuronas de PVN. No se pudo detectar la activación o inhibición de CRF a partir de la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN ya que la marcación de CRF mediante inmunohistoquímica no fue exitosa. Finalmente, los resultados indican que DYN-A₂₋₁₇ causó un aumento significativo en los niveles de ACTH plasmático en comparación con el grupo control (aCSF).

7.1. Efectos del bloqueo de receptores de CRF en el cerebro DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimentos

Hasta ahora los antecedentes disponibles indicaban que DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumenta simultáneamente la actividad física y la ingesta de alimentos en ratones (Gac *et al.*, 2016), dejando sin resolver los posibles mecanismos neuronales que median estos efectos de DYN-A₂₋₁₇ en PVN. Nuestra hipótesis señala que los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en ingesta de alimentos en PVN dependerían de la señalización de CRF en este núcleo del cerebro. Esta hipótesis se fundamenta en varios resultados experimentales. Existe una co-producción y co-liberación de neuropéptidos DYN y orexina desde neuronas de orexina del hipotálamo lateral hacia PVN (Chou *et al.*, 2001, Muschamp *et al.*, 2014, Peyron *et al.*, 1998), que la inyección de DYN-A₂₋₁₇ o OXA en PVN aumenta de forma aguda la ingesta de comida estándar y este efecto se potencia al co-inyectar ambos péptidos (Gac

et al., 2016). Además, OXA modula la actividad de CRF en PVN, la administración central de OXA activa el eje HPA (Al-Barazanji *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2017), aumenta la concentración de ACTH en plasma (Al-Barazanji *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2005) y activa las neuronas de CRF (Kuru *et al.*, 2000; Follwell y Ferguson, 2002; Sakamoto *et al.*, 2004), que induce la liberación local de CRF y activación de los receptores de CRF en PVN (Imaki *et al.*, 1996; Mansi *et al.*, 1996; Dabrowska *et al.*, 2013). Por tanto, si DYN-A₂₋₁₇ tiene efectos conductuales similares a OXA, entonces razonamos que los efectos de DYN-A₂₋₁₇ podrían tener mecanismos de acción similares a los de OXA, específicamente activando neuronas CRF en PVN.

Para evaluar esta hipótesis, examinamos en primer lugar el efecto de la administración intra-PVN de α CRF₉₋₄₁ (antagonista del receptor 2 de CRF) en la ingesta de alimentos causado por DYN-A₂₋₁₇ en este sitio del cerebro. Nuestros resultados muestran que la inyección de α CRF₉₋₄₁ en PVN aumentó la ingesta de alimentos (**Figura 8**), lo que concuerda con estudios previos que indican que la inyección ventricular o intra-PVN de α CRF₉₋₄₁ en ratas puede revertir la disminución de la alimentación causada por el estrés o potenciar los efectos de otros neuropéptidos (Krahn *et al.*, 1986; Heinrichs y Koob, 1992; Heinrichs *et al.*, 1993). Además, consistentemente con estudios previos (Gac *et al.*, 2016), la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumentó la ingesta de alimentos. Por tanto, que la inyección de α CRF₉₋₄₁ en PVN bloqueara los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la ingesta de alimentos fue un resultado inesperado. En PVN, la habilidad de OXA para activar las neuronas PVN dependen de otros neuropéptidos, como NPY (Russell *et al.*, 2001), lo que sugiere que los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en PVN también podrían depender también de la modulación de otros neuropéptidos. Una interpretación de nuestros datos es que existen circuitos neuronales distintos en PVN para el control de la ingesta de alimentos por DYN-A₂₋₁₇ y CRF que tienen conexiones inhibitorias cruzadas. Sin embargo, son necesarios más experimentos para delinear los circuitos neuronales responsables de los efectos de alimentación de DYN-A₂₋₁₇.

7.2. Efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la activación de neuronas de PVN.

Otro de nuestros objetivos fue demostrar que DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas del PVN. Para esto, se decidió medir mediante inmunohistoquímica la presencia del marcador nuclear de actividad neuronal FOS en ratones inyectados con DYN-A₂₋₁₇ (3 nmol) o aCSF en PVN. Además del rol de FOS como marcador de actividad neuronal (Bullitt, 1990), el uso de esta técnica se apoya en que la administración i.c.v. de OXA incrementa la expresión de FOS en PVN (Kuru *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2004), lo que se alinea con nuestra hipótesis de que OXA y DYN-A₂₋₁₇ tienen similares mecanismos de acción en PVN. Sin embargo, los resultados no muestran una diferencia significativa en el número de neuronas inmunorreactivas para FOS en PVN entre el grupo control y el tratado con DYN-A₂₋₁₇ (**Figura 9**).

La ausencia de un aumento significativo en el número de neuronas inmunorreactivas para FOS en PVN después de inyección de DYN-A₂₋₁₇ contrasta con el aumento que este mismo péptido causa en la concentración plasmática de ACTH (**Figura 10**). En conjunto con el efecto de DYN-A₂₋₁₇ en consumo de alimentos, estos resultados indican que la inyección en PVN de DYN-A₂₋₁₇ si afecta la actividad de neuronas en PVN, sugiriendo que la falta de una diferencia significativa en el número de neuronas inmunorreactivas para FOS en PVN entre ratones inyectados en PVN con DYN-A₂₋₁₇ en comparación al control obedece a problemas de optimización de la técnica de inmunodetección de FOS más que a un verdadero negativo biológico. También es posible que la difusión del péptido de DYN-A₂₋₁₇ a partir de la inyección no fue completa desde la cánula hasta PVN (1mm de distancia entre la cánula y PVN), lo que disminuiría su efecto en neuronas del PVN o que la expresión de FOS decaiga antes de los 90 min usados como punto para la preparación de las muestras y medición después de la inyección intra-PVN. En este caso, disminuiría la sensibilidad de la técnica de inmunohistoquímica enmascarando diferencias que podrían haber sido detectadas de usar un tiempo menor de espera después de la inyección. Para la validación de la técnica se utilizó como control positivo la inmunodetección de OXA en cortes de LH, núcleo del hipotálamo donde se sabe que se expresa OXA y como controles negativos se omitió el anticuerpo primario y se

reemplazó por la solución de BSA sin anticuerpo. A pesar de que se logró detectar inmunorreactividad para FOS el resultado obtenido puede surgir a partir de una baja sensibilidad del anticuerpo primario utilizado. En estudios futuros se debiera utilizar otros anticuerpos primarios que tengan una mayor sensibilidad para detectar FOS o utilizar otras técnicas para evaluar si DYN-A₂₋₁₇ es un neuropéptido que activa neuronas del PVN. Entre estas se podría usar la medición de calcio intracelular utilizando un indicador de calcio fluorescente como Fura-2/AM.

Con respecto a los efectos de DYN-A₂₋₁₇ en la activación de neuronas de PVN, también se estudió la activación de neuronas que expresan CRF en PVN. Nuestra hipótesis era que DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas en PVN, esto a partir de que orexina-A modula la actividad de CRF en PVN, la administración central de orexina-A incrementa la expresión del mensajero de CRF en PVN (Al-Barazanji *et al.*, 2001). Por lo que si DYN-A₂₋₁₇ tiene efectos similares a orexina activaría las neuronas de CRF en PVN. El resultado para la marcación de CRF mediante inmunohistoquímica fue negativo por lo que no se pudo detectar la presencia de CRF a partir de la activación de neuronas que expresan CRF en PVN. Al igual que para la detección de FOS, para la validación de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de CRF se utilizó como control positivo la inmunodetección de OXA en cortes de LH y como control negativo se omitió el anticuerpo primario y se reemplazó por la solución de BSA sin anticuerpo. Las estrategias para optimizar la técnica de inmunohistoquímica que consistieron en aumentar la concentración del anticuerpo primario y el tiempo de incubación de este, no fueron exitosas. Es posible que el anticuerpo primario usado no era lo suficientemente sensible para detectar el o los epítopes de CRF que permitieran su detección, por lo que queda ampliar el experimento de marcaje utilizando otros anticuerpos. La baja concentración de CRF pudo afectar su detección, es por esto que se inyectó colchicina i.c.v, que bloquea el transporte anterógrado (desde el soma neuronal hacia las terminales axonales) de las vesículas que contienen neuropéptidos permitiendo la acumulación de los neuropéptidos en el soma lo que facilitaría su detección por inmunohistoquímica (Dabrowska *et al.*, 2011). Se utilizaron diferentes concentraciones de colchicina, pero no fue posible la detección de CRF por lo que la inyección de colchicina pudo ser defectuosa.

Finalmente, a partir del resultado negativo del marcaje de CRF en PVN y con el objetivo de analizar si DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas de CRF en PVN, se analizó la concentración de ACTH plasmático en respuesta a inyecciones de DYN-A₂₋₁₇ en PVN. La administración de OXA en PVN aumenta la concentración plasmática de ACTH (Al-Barazanji *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2017) por lo que si DYN-A₂₋₁₇ tiene efectos similares a orexina también aumentaría los niveles de ACTH en plasma. Nuestros resultados muestran que la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN aumenta la concentración de ACTH plasmático que es consistente con la activación de neuronas que expresan CRF en PVN (Al-Barazanji y col., 2001; Russell *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2005) (**Figura 10**). Este resultado sugiere que DYN-A₂₋₁₇ activa neuronas que expresan CRF en PVN. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para demostrar de forma directa la activación local de CRF en PVN por la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en este núcleo a través de técnicas que permitan la detección local (en PVN) de CRF como inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

8. CONCLUSION Y PROYECCIONES

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que DYN-A₂₋₁₇ es un neuropéptido que promueve la ingesta de alimento a través de sus acciones en PVN las cuales dependerían de la señalización local de CRF en PVN.

Experimentos futuros deberían confirmar la activación local de CRF por la inyección de DYN-A₂₋₁₇ en PVN y determinar los receptores de DYN-A₂₋₁₇ que median sus efectos en conducta incluyendo ingesta de alimentos. Finalmente cabe resaltar el potencial biotecnológico a partir de la identificación de mecanismos biológicos de acción del neuropéptido no opioide DYN-A₂₋₁₇, su regulación e interacción con otros neuropéptidos lo que contribuirá en entender la regulación de la alimentación y del balance energético facilitando el diseño de posibles terapias para el tratamiento de patologías de trastornos de alimentación.

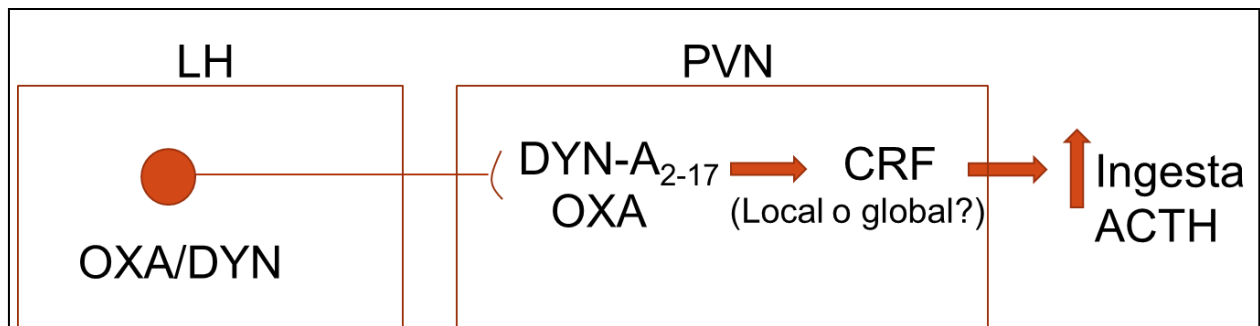


Figura 11. Modelo propuesto. Modelo propuesto de mecanismo de acción de DYN-A₂₋₁₇ en PVN que aumentan la ingesta de alimento. Los efectos de DYN-A₂₋₁₇, proveniente de neuronas de OXA/DYN ubicadas en LH, estarían mediados por activación de CRF en PVN, lo que provoca un aumento en la ingesta de alimento y ACTH plasmático.

9. REFERENCIAS

- Alvarez B., Barrientos T., Gac L., Teske J. A., & Perez-Leighton, C. E³. Effects on Hedonic Feeding, Energy Expenditure and Balance of the Non-opioid Peptide DYN-A₂₋₁₇. (2018). *Neuroscience*, 371, 337-345. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.11.044.
- Al-Barazanji, K. A., Wilson, S., Baker, J., Jessop, D. S., & Harbuz, M. S. (2001). Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(5), 421–424. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00655.x>
- Atasoy, D., Betley, J., Su, H., & Sternson, S. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172–177. doi:10.1038/nature11270
- Blevins, J. E., & Ho, J. M. (2013). Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 14(4), 311–29. doi:10.1007/s11154-013-9260-x
- Bodnar, C. M. (2016). Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides*, 75, 18–70. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.10.009>
- Bullitt E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.*, 296(4), 517-30.
- Cabral A., Suescun O., Zigman J. M., Perello M. (2012). Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents *Plos One*, 7(2), e31462. doi: 10.1371/journal.pone.0031462.
- Cavicchini E, Candeletti S, Spampinato S & Ferri S. (1989). Hypothermia elicited by some prodynorphin-derived peptides: opioid and non-opioid actions. *Neuropeptides*, 14(1), 45–50. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(89\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0143-4179(89)90033-4)

- Choi Y. H., Hartzell D., Azain M. J., & Baile C. A. (2002). TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiology & Behavior*, 77(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00784-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00784-9)
- Chou T. C, Lee C. E, Lu J, Elmquist J. K, Hara J, Willie J. T, Beuckmann C. T, Chemelli R. M, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper C. B & Scammell T. E. (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *Journal of Neuroscience*, 21(19), RC168. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-j0003.2001>
- Dabrowska, J., Hazra, R., Guo, J. D., DeWitt, S., & Rainnie, D. G. (2013). Central CRF neurons are not created equal: Phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 AUG), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fnins.2013.00156>
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 322–7. doi:10.1073/pnas.95.1.322
- Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz A. R, Polotsky V. Y & Mendelowitz D (2017). Optogenetic identification of hypothalamic orexin neuron projections to paraventricular spinally projecting neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312(4). doi: 10.1152/ajpheart.00572.2016
- Dube M. G, Kalra S. P & Kalra P. S. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Research*, 842(2), 473-7. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01824-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01824-7)
- Gac, L., Butterick, T. A., Duffy, C. M., Teske, J. A., & Perez-Leighton, C. E. (2016). Role of the non-opioid dynorphin peptide des-Tyr-dynorphin (DYN-A2-17) in food intake and physical activity, and its interaction with orexin-A. *Peptides*, 76, 14–18. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.12.001>

- Gosnell B. A, Levine A. S & Morley J. E (1986a) The stimulation of food intake by selective agonists of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sciences*, 38(12), 1081–1088. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90243-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90243-2)
- Gosnell B.A, Morley J.E & Levine A.S (1986b) Opioid-induced feeding: localization of sensitive brain sites. *Brain Research*, 369 (1-2), 177–184. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90526-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90526-3)
- Ikeda, H., Ardianto, C., Yonemochi, N., Yang, L., Ohashi, T., Ikegami, M., ... Kamei, J. (2015). Inhibition of opioid systems in the hypothalamus as well as the mesolimbic area suppresses feeding behavior of mice. *Neuroscience*, 311, 9–21. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.002>
- Imaki T, Naruse M, Harada S, Chikada N, Imaki J, Onodera H, Demura H & Vale W. (1996). Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research* ,38(1),166–170. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(96\)00011-3](https://doi.org/10.1016/0169-328X(96)00011-3)
- Kiwaki K, Kotz C. M, Wang C, Lanningham-Foster L & Levine J.A. (2004). Orexin A (hypocretin 1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats. *Am J Physiol Endocrinology and Metabolism*. 286(4), E551–E559. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00126.2003>
- Kotz, C. M. (2006). Integration of feeding and spontaneous physical activity: Role for orexin. *Physiology and Behavior*, 88(3), 294–301. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.031>
- Kotz, C., Nixon, J., Butterick, T., Perez-Leighton, C., Teske, J., & Billington, C. (2012). Brain orexin promotes obesity resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264(1), 72–86. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06585.x>
- Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Grace, M., & Levine, A. S. (1986). CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. *Brain Research Bulletin*, 17(3), 285–289. [http://doi.org/10.1016/0361-9230\(86\)90233-9](http://doi.org/10.1016/0361-9230(86)90233-9)

- Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., Nakazato, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., & Yamashita, H. (2000). Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*, 11(9), 1977–80. <http://doi.org/10.1097/00001756-200006260-00034>
- Lai, J., Luo, M. chyi, Chen, Q., & Porreca, F. (2008). Pronociceptive actions of dynorphin via bradykinin receptors. *Neuroscience Letters*, 437(3), 175–179. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.088>
- Lai, S. L., Gu, Y., & Huang, L. Y. M. (1998). Dynorphin uses a non-opioid mechanism to potentiate N-methyl-D- aspartate currents in single rat periaqueductal gray neurons. *Neuroscience Letters*, 247(2-3), 115–118. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00293-6](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00293-6)
- Leibowitz, S, F., Hammer, N, J.& Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol.Behav*, 27(6), 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90366-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90366-8)
- Liyanarachchi, K., Ross, R., & Debono, M. (2017). Human studies on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 31(5), 459-473. doi: 10.1016/j.beem.2017.10.011.
- Mansi JA, Rivest S & Drolet G. (1996). Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology*, 137(11), 4619–4629. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895325>
- Moñnikes H, Heymann-Moñnikes I & Tache´ Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. *Brain Research*, 574(1-2), 70–76. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90801-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90801-F)
- Moreno G, Perello´ M, Gaillard RC & Spinedi E. (2005). Orexin a stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function, but not food intake, in the absence of full hypothalamic NPY-ergic activity. *Endocrine*, 26(2), 99–106.

- Morton, G. J., Thatcher, B. S., Reidelberger, R. D., Ogimoto, K., Wolden-Hanson, T., Baskin, D. G., Blevins, J. E. (2012). Peripheral oxytocin suppresses food intake and causes weight loss in diet-induced obese rats. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 302(1), E134–E144. doi:10.1152/ajpendo.00296.2011
- Muschamp J. W, Hollander J. A, Thompson J. L, Voren G, Hassinger L. C, Onvani S, Kamenecka T. M, Borgland S. L, Kenny P. J & Carlezon WA. (2014). Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(16), E1648–E1655. doi:10.1073/pnas.1315542111
- Perez-Leighton, C. E., Boland, K., Teske, J. a., Billington, C., & Kotz, C. M. (2012). Behavioral responses to orexin, orexin receptor gene expression, and spontaneous physical activity contribute to individual sensitivity to obesity. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 303(7), E865–E874. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00119.2012>
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, a N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9996–10015. <http://doi.org/10.1.1.335.5389>
- Russell S. H, Small C. J, Sunter D, Morgan I, Dakin C. L, Cohen M. A & Bloom S. R. (2002). Chronic intraparenchymal administration of orexin A in male rats does not alter thyroid axis or uncoupling protein-1 in brown adipose tissue. *Regulatory Peptides*, 104 (1-3),61–68. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(01\)00349-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00349-4)
- Sakamoto, F., Yamada, S., & Ueta, Y. (2004). Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: Possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regulatory Peptides*, 118(3), 183–191. <http://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.12.014>

- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., ... Bergsma, D. J. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. Recent efforts in genomics research have identified a large number of cDNA sequences that encode "orphan"; *Cell*, 92, 573–585. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80949-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6)
- Schwarzer, C. (2009). Europe PMC Funders Group 30 Years of Dynorphins – New Insights on Their Functions in Neuropsychiatric Diseases, 123(3), 353–370. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.006.30>
- Shukla, V. K., & Lemaire, S. (1992). Central non-opioid physiological and pathophysiological effects of dynorphin A and related peptides. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 17(3), 106–119.
- Sominsky, L., & Spencer, S. J. (2014). Eating behavior and stress: A pathway to obesity. *Frontiers in Psychology*, 5(MAY), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00434>
- Taha S. A. (2010). Preference or fat? Revisiting opioid effects on food intake. *Physiol Behav*, 100(5), 429–437. doi:10.1016/j.physbeh.2010.02.027
- Tang, Q., Gandhoke, R., Burritt, a, Hruby, V. J., Porreca, F., & Lai, J. (1999). High-affinity interaction of (des-Tyrosyl) dynorphin A (2-17) with NMDA receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291(2), 760–765.
- Tang, Q., Lynch, R. M., Porreca, F., & Lai, J. (2000). Dynorphin A elicits an increase in intracellular calcium in cultured neurons via a non-opioid, non-NMDA mechanism. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2610–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805661>
- Tsushima H, Mori M & Matsuda T. (1993). Microinjection of dynorphin into the supraoptic and paraventricular nuclei produces antidiuretic effects through vasopressin release. *Jpn J Pharmacol*, 63(4), 461–468. <https://doi.org/10.1254/jjp.63.461>

- Valassi E, Scacchi M & Cavagnini F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18(2), 158-68. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Vanderah T. W, Laughlin T, Lashbrook J. M, Nichols M. L, Wilcox G. L, Ossipov M. H, Malan T. P & Porreca F. (1996). Single intratecal injections of dynorphin A or des-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. *Pain* 68(2-3), 275–281.
- Walker J. M, Moises H. C, Coy D. H, Baldrighi G & Akil H. (1982a) Nonopiate effects of dynorphin and des-Tyr-dynorphin. *Science* 218(4577), 1136–1138. DOI: 10.1126/science.6128791
- Walker J. M, Tucker D. E, Coy D. H, Walker B. B & Akil H (1982b). Des-tyrosine-dynorphin antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol* 85(1), 121–122. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(82\)90433-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90433-2)
- Wollemann M & Benyhe S (2004). Non-opioid actions of opioid peptides. *Life Sciences*, 75 (3), 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.12.005>
- Young EA, Walker JM, Houghten R, Akil H (1987). The degradation of dynorphin A in brain tissue in vivo and in vitro. *Peptides* 8 (4): 701–707. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(87\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0196-9781(87)90046-5)

10.TABLAS

10.1. Tabla 1. Protocolo tinción de Nissl con tionina para posicionamiento de cánulas

Protocolo tinción de Nissl con tionina para posicionamiento de cánulas		
Buffer acetato	1min	@TA
Tionina 0.1% (buffer acetato + solución tionina 1%)	1-3min	@TA
Buffer acetato (agua destilada+ ácido acético 1M + acetato de sodio 1M)	30seg	@TA
Deshidratación		
-Etanol 10%	15seg	@TA
-Etanol 30%	15seg	@TA
-Etanol 50%	15seg	@TA
-Etanol 70%	15seg	@TA
-Etanol 95%	2min	@TA
-Etanol 95%	2min	@TA
-Etanol 100%	2min	@TA
-Etanol 100%	2min	@TA
Xileno	2-4min	@TA
Montaje con Entellan		@TA

10.2. Tabla 2. Protocolo estándar para inmunohistoquímica

Protocolo estándar IHQ enzimática		
Día 1		
Lavados con PBS 1X	3x5min	@TA
Bloqueo Peróxido endógeno H ₂ O ₂ 3% en Metanol absoluto	5min	@TA
Lavados con Tritón x100 0,3% en PBS1X	3x5min	@TA
Bloqueo de proteínas con BSA 3%+ Tritón x100 0,3% en PBS1X	1 hora	@TA
Incubación Ac primario	Overnight	@TA
Día 2		
Lavados con PBS1X	3x5min	@TA
Incubación Ac Secundario	90min	@TA
Lavados con PBS1X	3x5min	@TA
Incubación con Kit ABC	1 hora	@TA
Lavados con PBS1X	3x5min	@TA
Incubación con DAB/níquel	10min	@TA
Lavados con PBS1X	3x5min	@TA
Secados de placas	24 horas	@TA
Montaje con Entellan		@TA

